

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

⑪ N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 475 737

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②① **N° 80 02658**

⑤④ Perfectionnements apportés aux procédés de conservation d'hématies par lyophilisation en vue de leur utilisation dans des réactions d'héماغglutination et hématies non agglutinables spontanément obtenues par ce procédé.

⑤① Classification internationale (Int. Cl.³). G 01 N 33/96.

②② Date de dépôt 7 février 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée :

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 33 du 14-8-1981.

⑦① Déposant : INSTITUT PASTEUR, Fondation reconnue d'utilité publique et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE, INSERM, Etablissement public, résidant en France.

⑦② Invention de : Nicole Cabau née Philippon, Florian Horaud et André Boué.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

⑦④ Mandataire : Cabinet Ores,
6, av. de Messine, 75008 Paris.

La présente invention est relative à des perfectionnements apportés aux procédés de conservation des hématies par lyophilisation, en vue de leur utilisation dans des réactions d'hémagglutination standardisées.

5 Les réactions d'agglutination utilisant des hématies, sont actuellement pratiquées à grande échelle, aussi bien dans les laboratoires d'analyses que dans les laboratoires de recherches, du fait qu'elles présentent le grand avantage d'une très grande sensibilité (environ 1 000 fois plus grande que
10 la sensibilité de l'analyse par précipitation). Toutefois, les hématies sont des produits très instables qu'il est nécessaire de soumettre à un traitement propre à assurer leur stabilité dans le temps et la conservation de celles de leurs propriétés qui sont nécessaires à leur application dans les réactions
15 d'agglutination.

C'est la raison pour laquelle de nombreuses techniques de conservation et de stockage ont été mises au point, parmi lesquelles on citera notamment les suivantes :

- traitement des érythrocytes lavés et tamponnés, par de
20 l'aldéhyde pyruvique et par du formol (Brevets américains 3 714 345, 3 717 427) ;
- traitement des érythrocytes lavés et tamponnés, par les aldéhydes pyruvique et formique suivi d'une enduction par l'albumine de sérum bovin (Brevet allemand 2 025 718) ;
- 25 - traitement des érythrocytes par le glutaraldéhyde et lyophilisation en présence du lactose [S. IWASA et Collab. dans J. of Clin. Microb. (1977) pages 176-178];
- traitement des érythrocytes par un aldéhyde aliphatique et un sel soluble de chrome (Brevet français 2 331 352).

30 Il ressort clairement de la pratique de toutes ces méthodes qu'il est indispensable de lyophiliser les hématies pour assurer leur stabilité. Cependant, jusqu'à présent, la lyophilisation impose une opération de fixation préalable par des aldéhydes tels que pyruvate, formaldéhyde, glutaraldéhyde,
35 par exemple, sans laquelle les hématies lyophilisées n'ont pas la stabilité recherchée. Néanmoins, malgré toutes ces précautions, on constate avec ces procédés antérieurs de stabilisation des hématies par lyophilisation, une agglutination spontanée des hématies.

La situation est la même dans le cas des hématies sensibilisées par un antigène, dont la durée de conservation est faible, puisqu'elle n'est généralement que de quelques jours et n'atteint, au mieux, que quelques semaines.

5 Comme la sensibilisation des hématies doit être réalisée dans des conditions très précises et demande un personnel hautement spécialisé et entraîné, des réactifs purs, stériles et fraîchement préparés, il est indispensable, notamment pour pouvoir appliquer le procédé d'agglutination indi-
10 recte ou passive dans des conditions économiques satisfaisantes, de mettre au point un procédé de conservation des hématies sensibilisées. Différentes méthodes ont, de ce fait, été proposées pour améliorer le stockage et la conservation des hématies sensibilisées aux antigènes : il s'agit principalement des méthodes suivantes :

- traitement des érythrocytes par revêtement aux tannins

C'est BOYDEN [J. EXP. MED. 93 (1951) 107] qui s'est aperçu que les protéines peuvent s'adsorber sur des hématies traitées au tannin et qu'elles peuvent par la suite, être
20 agglutinées par les sérums contenant les antiprotéines spécifiques

- couplage ou pontage covalent des protéines sur la surface des hématies

On a préconisé également le couplage des antigènes
25 sur la surface des hématies par différentes méthodes comme par exemple :

- par bisdiazotation
- par traitement avec les groupes dinitrophényle [LEVINE et Collab. J. Immunol. 98 (1967) 648]
- 30 - par pontage à l'aide des aldéhydes [Brevet français 2 187 909, Brevet français 1 493 772, Brevet américain 3 987 159].

Toutes ces méthodes ont en effet eu pour résultat une amélioration indéniable de la conservation des hématies
35 sensibilisées, mais toutes ont également leur faiblesse : la liaison des antigènes sur des globules rouges tannés s'est avérée quelque peu réversible, tandis que les méthodes de couplage ou de pontage des antigènes nécessitent beaucoup plus d'antigène.

D'autre part, toutes ces méthodes préconisées dans l'Art antérieur sont très "rigides" et ne tiennent pas suffisamment compte de la nature même des antisérums et des antigènes qui peuvent différer non seulement d'une espèce à l'autre, mais même, pour un antigène donné, d'un lot de fabrication à l'autre.

La présente invention s'est par conséquent fixé pour but de pourvoir à un procédé de conservation des hématies, qu'il s'agisse d'hématies normales ou d'hématies sensibilisées, fiable et économique, qui permet d'obtenir des hématies aptes à donner lieu à des réactions spécifiques, notamment à des réactions d'hémagglutination spécifiques, et qui permet également d'obtenir des hématies sensibilisées, par un antigène notamment, qui conservent leur pouvoir antigénique pendant de très longues périodes ; la présente invention s'est en outre donné pour but de pourvoir à un procédé qui permet une standardisation parfaite des réactions d'hémagglutination indirecte.

La présente invention a pour objet un procédé de conservation des hématies en vue de la standardisation de la réaction d'hémagglutination, caractérisé en ce que l'on traite le sang total non centrifugé et non lavé, préalablement recueilli sur un agent anti-coagulant, par un agent de fixation tel qu'un aldéhyde, en ce qu'on centrifuge le sang ainsi traité, pour en séparer les hématies fixées, et en ce qu'on lyophilise les hématies ainsi séparées.

Ainsi, le fait de soumettre du sang total n'ayant subi ni centrifugation, ni lavage, à un traitement de fixation par un aldéhyde, et de combiner cette première étape du procédé conforme à la présente invention à un traitement de lyophilisation des hématies consécutif à une étape de séparation de ces dernières par centrifugation du sang total traité par un aldéhyde comme indiqué ci-dessus, procure des hématies qui ne subissent aucune agglutination spontanée et sont, de ce fait, aptes à donner lieu à des réactions d'hémagglutination d'un degré de spécificité élevé, et qui, lorsqu'elles sont sensibilisées par un antigène ou par un anticorps, présentent une stabilité remarquable pendant de très longues périodes de temps.

Les Inventeurs ont pu démontrer que la centrifugation préalable du sang total, même prélevé sous un anticoagulant, est suffisante pour modifier les propriétés des hématies, lesquelles présentent ensuite, après lyophilisation, une hémagglutination spontanée qui les rend inutilisables pour les tests d'hémagglutination auxquels elles étaient en fait destinées. Ils ont pu mettre en évidence que pour que la lyophilisation procure les qualités de stabilité que l'on était en droit d'en attendre, il est indispensable d'éviter que les hématies présentes dans le sang, subissent l'influence des forces de cisaillement dues à la centrifugation et au lavage, préalablement au traitement de fixation par les aldéhydes.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé qui fait l'objet de la présente invention, appliqué à la préparation d'hématies sensibilisées par une protéine spécifique, les hématies fixées par un aldéhyde puis séparées du sang total par centrifugation, sont ensuite traitées par un tannin, puis par ladite protéine spécifique, avant d'être lyophilisées.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la protéine spécifique de sensibilisation des hématies est prise dans le groupe qui comprend notamment les antigènes viraux, les antigènes bactériens, les antigènes parasitaires, les anticorps purifiés (IgG) et les anticorps monoclonaux préparés in vitro.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, l'aldéhyde, ainsi que, le cas échéant, le tannin et la protéine spécifique sont mis en oeuvre dans des solutions tampons appropriées, les concentrations optimales d'aldéhyde, de tannin et de protéine spécifique étant déterminées pour chaque lot de protéine spécifique.

Suivant une disposition avantageuse de cette modalité du procédé objet de la présente invention, les tampons mis en oeuvre sont des tampons stériles.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux du procédé objet de la présente invention, après avoir été séparées par centrifugation, les hématies sont soumises à un lavage par du PBS (tampon phosphate-liquide physiologique).

Suivant un autre mode de réalisation avantageux de l'objet de l'invention, l'aldéhyde mis en oeuvre est le for-

mol.

Suivant un autre mode de réalisation avantageux de l'objet de l'invention, l'aldéhyde utilisé est le glutaraldéhyde.

5 Conformément à l'invention, le traitement de fixation par un aldéhyde, le traitement par un tannin et la sensibilisation par des protéines spécifiques, s o n t e f-
fectués à une température comprise entre 20 et 37°C environ, la durée du traitement de fixation par un aldéhyde étant de
10 préférence comprise entre 16 et 18 heures, tandis que la durée du traitement par le tannin est comprise entre 10 et 20 minutes, de même que la durée du traitement de sensibilisation par les protéines spécifiques.

Suivant un mode de réalisation avantageux du procédé
15 de objet de la présente invention, les traitements des hématies par l'aldéhyde et par le tannin, sont effectués à de grandes dilutions, de l'ordre de 1/300 à 1/600 pour l'aldéhyde, et de 1/40 000 à 1/160 000 pour le tannin.

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'objet
20 de l'invention, la lyophilisation est effectuée en présence de lactose et d'albumine bovine, dans un tampon phosphate approprié.

La présente invention a également pour objet les hématies fixées par un aldéhyde et lyophilisées, utilisables
25 dans les réactions d'héماغglutination, obtenues en mettant en oeuvre le procédé conforme à l'invention, ainsi que les hématies sensibilisées par une protéine spécifique prise dans le groupe des antigènes viraux, des antigènes bactériens, des antigènes parasitaires, des anticorps, notamment des anti-
30 corps purifiés et des anticorps monoclonaux préparés in vitro. La présente invention a notamment pour objet les hématies sensibilisées par un antigène viral de la famille des Virus Herpès, ainsi que des IgG.

Les antigènes viraux mis en oeuvre pour la sensibi-
35 lisation des hématies sont obtenus à partir de cellules infectées, de préférence à l'aide d'une pluralité d'opérations de congélation et décongélation successives et rapides.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la

description qui va suivre.

La présente invention vise plus particulièrement le procédé de conservation des hématies par lyophilisation en vue de leur utilisation dans des réactions d'hémagglutination, 5 conforme aux dispositions qui précèdent, les moyens propres à la mise en oeuvre de ce procédé, les procédés d'ensemble et les chaînes de fabrication dans lesquelles est inclus le procédé conforme à la présente invention, ainsi que les hématies, sensibilisées ou non, obtenues selon le procédé conforme à la présente invention.

10 L'invention pourra être mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, ainsi qu'à un exemple de titrage des sérums à l'ai-
15 de des hématies sensibilisées conformes à la présente inven-
tion.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, mais n'en constituent en aucune manière une limitation.

20 EXEMPLE I

A - Préparation de l'antigène

(Antigène viral de la famille des virus Herpès).

La souche utilisée est la souche AD 169 cultivée sur fibroblastes humains. Après plusieurs passages en milieu de 25 Eagle et divers flacons de cellules vierges, on obtient un grand volume de cellules infectées.

La récolte de l'antigène se fait quand on observe 90 % d'effet cytopathogène, soit environ 4 à 6 jours après l'infection des cellules. On jette alors le milieu, on rince 30 avec du PBS et on décolle les cellules. La composition du PBS ou tampon phosphate-liqueur physiologique est la suivante:

- NaCl	: 4,8 g
- KCl	: 1,2 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 6,9 g
- KH_2PO_4	: 1,2 g
- Eau distillée	: 1 600 ml

35 Au moment de l'emploi, on dilue au 1/3 avec de l'eau distillée.

Les cellules décollées sont alors reprises dans du PBS, à raison de 1 ml pour un flacon de culture de 75 ml. On opère alors trois congélations et décongélations successives et rapides. On centrifuge alors pendant une demi-heure environ à 5 000 T/mn et à 4°C. On recueille le surnageant contenant l'antigène que l'on répartit en ampoules, et que l'on conserve en azote liquide.

B - Traitement du sang au glutaraldéhyde

On utilise du glutaraldéhyde purifié, conservé sous vide en ampoules, et dilué à 10 % (à partir d'une ampoule-mère de glutaraldéhyde à 70 %). La dilution de glutaraldéhyde à utiliser est préparée au moment de l'emploi. Elle a été déterminée auparavant par le titrage de l'antigène (cf. plus loin : "détermination des concentrations optimum des réactifs").

Cette dilution est généralement comprise entre 1/150 et 1/250, et se fait dans du PBS.

On mélange alors du sang total de mouton recueilli stérilement sur un anticoagulant approprié tel que l'ALSEVER de préférence, directement et sans lavage préalable avec la dilution de glutaraldéhyde: 1 volume pour 1 volume. On a finalement dans le volume total, une dilution de glutaraldéhyde comprise entre 1/300 et 1/500.

Le mélange sang de mouton-glutaraldéhyde est incubé pendant 16 heures environ au bain-marie à 37°C.

Après ce temps, les globules rouges de mouton (GRM) sont lavés 5 fois par du PBS, et on les remet en suspension à 3 % dans le PBS. (Le volume total de cette solution à 3 % est fonction de la quantité des hématies sensibilisées que l'on veut préparer).

C - Traitement au tannin

La solution de tannin (dans du PBS) est préparée au moment de l'emploi. Pour cela : on pèse 0,01 g de tannin que l'on dissout dans 80 ml de PBS pour obtenir une solution à 1/8000. Cette solution est ensuite diluée (cf. plus loin : "détermination des concentrations optimum des réactifs") pour obtenir la concentration de tannin optimum. En général, on utilise une concentration de tannin comprise entre 1/80000 et 1/160000. Le tannin doit être parfaitement dissous et la solution homogène.

On mélange alors à volumes égaux, les GRM à 3 %

dans le PBS et le tannin. On incube au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes. On centrifuge alors le mélange et on lave dans du PBS et on reprend le culot de GRM tannés dans du tampon phosphate (pH 6,75), de façon à avoir une suspension de GRM à 3 %.

5 D - Sensibilisation à l'antigène viral

On prépare tout d'abord le tampon phosphate nécessaire pour cette opération. Il se compose de deux solutions :

- PO_4HNa_2 , 12H₂O, 0,15M correspondant à une concentration de 21,3 g/litre après dissolution dans du soluté physiologique
- 10 - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,15M, soit 20,4 g/litre après dissolution dans du soluté physiologique.

Pour obtenir le tampon à pH 6,75, on mélange au moment de l'emploi, 76 ml de PO_4HNa_2 et 24 ml de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

- On mélange ensuite à volumes égaux, la suspension à
- 15 3 % des GRM tannés dans du tampon phosphate et la dilution optimum d'antigène (cf. plus loin : "détermination des concentrations optimum des réactifs") dans le tampon phosphate. On incube le mélange pendant 15 minutes à 20°C environ, en agitant toutes les 5 minutes. Au bout de ce temps, on centrifuge, on lave
- 20 en PBS et on reprend le culot dans du PBS contenant 0,2 % d'albumine bovine (BSA) pour avoir une concentration globale de 1 % pour le titrage direct des anticorps sériques.

E - Lyophilisation

- Le culot des GRM sensibilisés est repris (à 6 %) dans
- 25 une solution de lactose à 5 % dans du PBS contenant 0,2 % d'albumine bovine.

EXEMPLE II

Traitement au formol

- On opère de la même manière qu'indiqué dans l'Exemple
- 30 I, sauf que l'on remplace le glutaraldéhyde par le formol.

Pour cela, le sang de mouton total prélevé sur ALSEVER est mélangé directement, sans lavage des GRM, avec une solution citrate-formol.

↳ Citrate de Na trisodique : 4,84 g

- 35 Formol à 30 % : 4 ml
- Eau distillée : 96 ml

volume à volume.

Le mélange est incubé pendant 16 heures environ au bain-marie à 37°C. Après ce temps, les GRM sont lavés 5 fois

ans du PBS, puis mis en suspension à 3 % dans du PBS. Le volume de la solution à 3 % est fonction de la quantité d'hématies sensibilisées que l'on veut préparer.

Titrage

5 Au moment du test, les hématies lyophilisées sont remises en suspension. Dans chaque ampoule, on ajoute 0,5 ml d'eau distillée et on agite pour rendre la suspension bien homogène, puis on transvase dans un tube à hémolyse. On dilue alors en ajoutant 2,5 ml de PBS contenant 0,2 % d'albu-
10 mine bovine (PBS + BSA).

Les sérums à tester sont traités au préalable pour éliminer les anticorps hétérophiles : pour cela, on fait une dilution à 1/10 dans du PBS, et on traite 1 ml de cette dilution avec 1 à 2 gouttes de culot globulaire obtenu à partir de GRM
15 frais et on incube 12 heures environ à 4°C. Au bout de ce temps, on centrifuge pendant 10 minutes à 2500 T/mn, et on recueille le surnageant.

Le culot globulaire est obtenu à partir de GRM frais, lavés 3 fois dans du PBS, le dernier surnageant devant être par-
20 faitement limpide.

Les réactifs sont disposés dans les cupules de la plaque de microtitration (cupules de Cooke en V à 8 rangées horizontales A à H), de façon à réaliser les combinaisons suivantes :

- 25 - pour la première rangée horizontale A :
 cupule 1 : sérum positif + GRM témoin
 cupule 2 : (PBS + BSA) + GR sensibilisés
 cupule 3 : sérum dilué 1/10 + GR sensibilisés
 puis dans les cupules suivantes : les dilutions croissantes
30 de sérum GR sensibilisés.
- dans la 2ème rangée horizontale B : mêmes combinaisons avec un sérum négatif et dans les autres rangées horizontales C à H, les différents sérums à tester.

On fait ainsi le titrage des anticorps dans les
35 sérums, en parallèle avec les témoins : 1 témoin sérum et 2 témoins antigène, qui permettent de contrôler la spécificité de la réaction.

En pratique, on procède ainsi : on distribue dans la plaque, les réactifs dans l'ordre suivant :

- 1) dans toutes les cupules avec la micropipette, 1 goutte (0,025 ml) de PBS + BSA
- 2) pour le sérum positif rangée A, 1 goutte de sérum dilué à 1/10 dans les cupules 1, 3 et 4
- 5 pour le sérum négatif dans la rangée B, 1 goutte de sérum dilué à 1/10 dans les cupules 1, 3 et 4
- Il en est de même dans chaque rangée horizontale, pour les différents sérums à tester.
- 3) avec un microdiluteur de capacité 0,025 ml par anse : on dilue par dédoublement successif à partir de la cupule 4 jusqu'à la cupule 12 de chaque rangée
- 10 4) on ajoute 1 goutte de PBS + BSA dans les cupules 2, 4, 5 et suivantes : ainsi un volume total de 0,05 ml par cupule est obtenu
- 15 5) on distribue les GR témoins dans les cupules de la rangée verticale 1 (témoin sérum) et les GR sensibilisés dans toutes les autres cupules de la plaque
- 6) on agite au microagitateur ou manuellement et bien horizontalement chaque plaque. On ferme avec du papier adhésif et on
- 20 laisse reposer une nuit (16 heures environ) à 4°C.

La lecture se fait le lendemain. On sort les plaques et on les laisse à la température ambiante pendant 10 minutes. Ensuite, on les incline à 70°, sur un portoir.

- La lecture doit se faire rapidement à partir du moment où les témoins (rangées 1 et 2) coulent. Il est préférable de ne pas lire trop de plaques en même temps.

On marque par 0 : les hématies qui "coulent"

par 4 : les hématies parfaitement agglutinées

par 2 : les hématies intermédiaires qui "coulent"

30 mal

Déterminations des concentrations optimum des réactifs

On procède au titrage de l'antigène dans des conditions variables de concentrations d'aldéhyde et de tannin.

- 35 On traite les GRM, comme il a été décrit à l'Exemple I, avec différentes concentrations d'aldéhyde : 1/150, 1/200, 1/250 et 1/300 (soit en final 1/300 à 1/600).

Chaque préparation est ensuite tannée avec trois dilutions de tannin : 1/40 000, 1/80 000 et 1/160 000.

On fait ensuite, avec chacune de ces douze préparations, un titrage de l'antigène (dans une microplaque à 96 cupules).

Dilution de l'antigène

- 5 Pour cela, on dispose une rangée de 9 tubes. L'antigène est dilué dans du tampon phosphate à pH 7,2 par dédoublements successifs à partir de la dilution à 1/4 (dans le premier tube).

- 10 Pour les douze tests : on met 2,4 ml de tampon phosphate dans tous les tubes, sauf le premier, ou on dilue au 1/4, 1,2 ml d'antigène + 3,6 ml de tampon phosphate. On mélange bien et on transvase 2,4 ml dans le deuxième tube, et ainsi de suite dans les huit tubes. Le neuvième tube ne reçoit que 2,4 ml de tampon phosphate : c'est celui des GRM
15 témoins non sensibilisés.

Dilution	1/4	1/8	1/16	1/32	Témoin
Antigène	1,2	2,4	2,4	2,4	0
Tampon phosphate	3,6	2,4	2,4	2,4	2,4

- On incube pendant 15 minutes à la température du
20 laboratoire (20°C). Puis, on centrifuge, on lave dans du PBS et on reprend le culot dans 7,2 ml de (PBS + BSA), de façon à avoir une suspension globulaire à 1 %.

Le test

- Pour chaque plaque, on dilue le sérum de référence :
25 on dépose 1 goutte de PBS contenant 0,2 % de BSA (PBS + BSA) dans tous les trous de la plaque (0,025 ml).

Dans chaque rangée horizontale de A à H, on dépose dans les cupules 1, 3 et 4, 1 goutte de sérum de référence dilué à 1/10 (et préalablement adsorbé avec des GRM frais).

- 30 On dilue ensuite à l'aide d'un microdiluteur par dédoublements successifs de la cupule 4 à la cupule 12 de chaque rangée.

- On dépose ensuite 1 goutte de (PBS + BSA) dans les cupules 2, 4, 5 et suivantes de toutes les rangées horizontales : un volume égal de 0,05 ml est ainsi distribué dans
35 toutes les cupules de la plaque.

Dans tous les trous de la rangée verticale 1, on dépose 1 goutte de GRM témoins.

Ensuite, dans les autres cupules de la rangée A,

on dépose les GRM sensibilisés par la dilution au 1/4 de l'antigène, dans celles de la rangée B, les GRM sensibilisés par la dilution au 1/8 de l'antigène, et ainsi de suite jusqu'à la rangée H où sont distribués les GRM sensibilisés par la dilution de 1/512 de l'antigène.

On agite chaque plaque, on la ferme à l'aide de papier adhésif et on laisse incubé 16 heures à 4°C.

Au bout de ce temps, on incline les plaques à 75° et on fait la lecture dès que les GR des rangées 1 (témoin sérum) et 2 (témoins antigène) "coulent".

On note 4 : les GRM agglutinés

0 : les GRM qui "coulent"

2 : les GRM intermédiaires qui "coulent" mal

On détermine la plaque dans laquelle le titrage de l'antigène donne une courbe régulière décroissante d'hémagglutination et où le titre est le plus fort pour un titre sérique le plus élevé et le plus proche du titre connu déterminé par hémagglutination classique avec des GRM frais.

On utilise ensuite la dilution choisie de glutaraldéhyde, celle du tannin et celle de l'antigène pour la préparation des GRM à traiter et à lyophiliser.

Il résulte de la description qui précède que, quels que soient les modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application adoptés, l'on obtient un procédé de conservation des hématies, et notamment des hématies sensibilisées par un antigène viral, notamment de la famille des virus Herpès, qui présente par rapport aux procédés visant au même but antérieurement connus, des avantages importants, et en particulier :

- l'avantage de pouvoir stocker les hématies, sensibilisées ou non, pendant de longues périodes,
- l'avantage de rendre les déterminations par hémagglutination sûres, reproductibles et très précises, et surtout
- l'avantage de pouvoir standardiser de manière fiable et économique les réactions d'hémagglutination indirecte, utilisables sans précaution particulière et à grande échelle par des opérateurs non spécialisés.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en

2475737

13

oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la
5 portée, de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1°- Procédé de conservation des hématies en vue de la standardisation de la réaction d'héماغglutination, caractérisé en ce que l'on traite le sang total non centrifugé et non lavé, préalablement recueilli sur un agent anti-coagulant, par un agent de fixation tel qu'un aldéhyde, en ce que l'on centrifuge le sang ainsi traité, pour en séparer les hématies fixées, et en ce qu'on lyophilise les hématies ainsi séparées.

2°- Procédé selon la Revendication 1, appliqué à la préparation d'hématies sensibilisées par une protéine spécifique, caractérisé en ce que les hématies fixées par un aldéhyde, puis séparées du sang total par centrifugation, sont ensuite traitées par un tannin, puis par ladite protéine spécifique, avant d'être lyophilisées.

3°- Procédé selon la Revendication 2, caractérisé en ce que la protéine spécifique de sensibilisation des hématies est prise dans le groupe qui comprend notamment les antigènes viraux, les antigènes bactériens, les antigènes parasitaires, les anticorps purifiés (IgG) et les anticorps monoclonaux préparés in vitro.

4°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'aldéhyde, ainsi que, le cas échéant, le tannin et la protéine spécifique sont mis en oeuvre dans des solutions tampons appropriées, les concentrations optimales d'aldéhyde, de tannin et de protéine spécifique étant déterminées pour chaque lot de protéine spécifique.

5°- Procédé selon la Revendication 4, caractérisé en ce que les tampons mis en oeuvre sont des tampons stériles.

6°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, après avoir été séparées par centrifugation, les hématies sont soumises à un lavage par du PBS.

7°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'aldéhyde mis en oeuvre est le formol.

8°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'aldéhyde utilisé est le glutaraldéhyde.

9°- Procédé selon l'une quelconque des Revendica-

tions 2 à 8, caractérisé en ce que la protéine spécifique est obtenue à partir de cellules infectées, à l'aide d'une pluralité d'opérations de congélation et décongélation successives et rapides.

5 10°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les traitements des hématies par l'aldéhyde et par le tannin sont effectués à des dilutions de l'ordre de 1/300 à 1/600 pour l'aldéhyde, et de 1/40 000 à 1/160 000 pour le tannin.

10 11°- Procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la lyophilisation est effectuée en présence de lactose et d'albumine bovine dans un tampon phosphate approprié, de préférence stérile.

12°- Procédé selon les Revendications 1, 4 et 10, caractérisé en ce que la détermination des concentrations optimum des réactifs est obtenue à l'aide des étapes successives suivantes :

- a) traitement des hématies contenues dans le sang total, par 3 à 8 concentrations différentes d'aldéhyde, lesquelles concentrations sont situées entre 1/300 et 1/600,
- 20 b) traitement de toutes les fractions de globules rouges traitées par l'aldéhyde comme indiqué en a), par 3 à 6 dilutions différentes de tannin, lesquelles dilutions sont situées entre 1/40 000 et 1/160 000,
- 25 c) titrage de toutes les préparations obtenues en b) par l'antigène à plusieurs dilutions : 1/4, 1/8, 1/16, 1/24,
- d) lecture du test.

13°- Hématies fixées par un aldéhyde et lyophilisées, obtenues en mettant en oeuvre le procédé selon la Revendication 1.

14°- Hématies sensibilisées par une protéine spécifique, obtenues en mettant en oeuvre le procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 12.

15°- Hématies sensibilisées selon la Revendication 14, caractérisées en ce qu'elles sont sensibilisées par une protéine spécifique prise dans le groupe qui comprend notamment les antigènes viraux, les antigènes bactériens, les antigènes parasitaires, les anticorps purifiés (IgG) et les anticorps monoclonaux préparés in vitro.

2475737

16

16°- Hématies sensibilisées selon la Revendication 15, caractérisées en ce qu'elles sont sensibilisées par un antigène viral de la famille des virus Herpès.